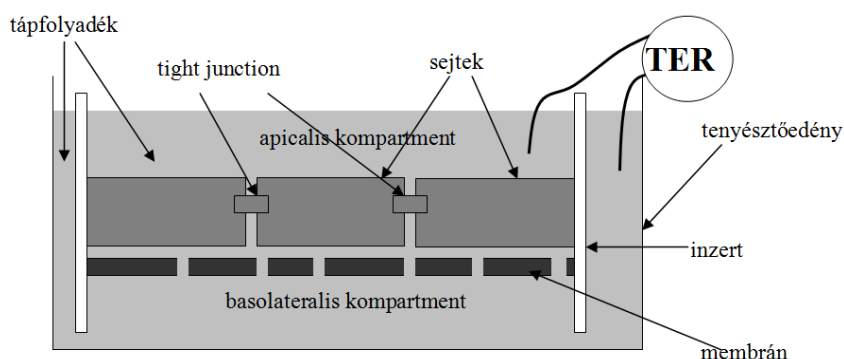


Az OTKA által támogatott, 76133 azonosító számú „A bélhámsejtek oxidatív stressz okozta gyulladásának gátlása probiotikus tejsavbaktériumokkal: hatásmechanizmus és alkalmazhatóság antibiotikum-helyettesítő hozamfokozásra választási malacokon” című pályázat zárójelentése.

Az elmúlt években a kis-dózisú antibiotikumok hozamfokozóként való felhasználását az Európai Közösség betiltotta, mivel bizonyos antibiotikumokkal szemben egyes kórokozó baktériumokban rezisztencia alakult ki. Ebből adódóan egyre növekszik az igény, hogy a kis-dózisú antibiotikumokat különféle természetes anyagok, probiotikumok váltsák fel. A probiotikumok olyan élő mikrobiális táp- illetve élelmiszer kiegészítők, amelyek elfogyasztva jótékony hatással vannak a gazdaszervezet egészségi állapotára, jó közérzetére. A probiotikumok pozitív hatásait már számos esetben igazolták a bélrendszer fertőzéseinek, rendellenességeinek illetve betegségeinek megelőzésében és/vagy kezelésében, azonban a jelenségek mögött húzódó mechanizmusok még sok esetben felderítésre várnak. Jelen pályázatban probiotikus baktériumok és anyagcsere termékeik hatását kívántuk tanulmányozni oxidatív stressz okozta citokin-termelés (IL-6, IL-8, TNF- α) mérséklésére.

Előkísérletek. Munkánk során először hidrogén-peroxiddal és a probiotikus baktériummal történő kezelés körülményeit pontosítottuk, hogy modellünk megfelelő legyen a további IPEC-J2 sertés jejunum sejtvonalon végzendő vizsgálatokhoz. Az előkísérletekhez humán vastagbél adenokarcinoma sejtvonalat (CaCo-2) használtunk, amely hasonlóan és spontán módon differenciálódik (transzepithelialis elektromos rezisztencia /TER/ mérés, **1. ábra**), mint a további kísérletekhez alkalmazott IPEC-J2 sertés jejunum sejtvonal.



1. ábra Az inzerten tenyésztett sejtek transzepithelialis elektromos rezisztencia /TER/ mérése

Vizsgáltuk a tenyésztés (tenyésztőedény felületén /inwert nélkül/, vagy membránon /inzerten/ szaporított sejtek), a H₂O₂ kezelés (koncentráció és időtartam) és a kereskedelmi forgalomban

kapható, bizonyítottan probiotikus törzsek sejtmentes szűrletével történő kezelés körülményeinek (/a/ előkezelés tejsavbaktériumok sejtmentes szűrletével, majd H₂O₂ kezelés, /b/ tejsavbaktériumok sejtmentes szűrletével és H₂O₂-val egy időben történő kezelés, majd végül /c/ H₂O₂-val, majd a tejsavbaktériumok sejtmentes szűrletével történő kezelés) hatását a sejtek életképességére (nekrózis, apoptózis) és IL-8 termelésére.

Eredményeink szerint az egy órás H₂O₂ kezelés esetén fellépő oxidatív-stressz következtében 24 óra múlva kialakuló sejthalál az inzert nélkül szaporított sejtek esetén már 1 mmol/l H₂O₂ kezelés során is fellép. Hasonló koncentrációjú (1 mmol/l H₂O₂) és időtartamú (1 óra) kezelésre az inzerten tenyésztett sejtek jóval ellenállóbbnak bizonyultak. Az inzerten szaporított sejtek esetében a sejthalál (nekrózis) csak 10 mmol/l vagy annál nagyobb koncentrációban alkalmazott H₂O₂ kezelést követően (már 24 órán belül) jelentkezett. Az inzerten tenyésztett sejtek esetében a TER alakulását az 1 mmol/l H₂O₂ kezelés nem változtatta meg szignifikánsan. A H₂O₂ kezelést követően kialakuló sejthalál típusa mind az inzert nélkül (1 mmol/l H₂O₂ kezelés), mind az inzerten (10 mmol/l H₂O₂ kezelés) szaporított sejtek esetben nekrozisnak mutatkozott (DAPI festés), apoptózisra utaló jegeket nem tudtunk kimutatni (Annexin V festés). Mind az inzert nélkül, mind az inzerten tenyésztett sejtek esetében a tápfolyadékban mérhető IL-8 koncentráció emelkedése a H₂O₂ kezelés koncentrációjával szignifikáns pozitív korrelációt mutatott és időfüggő volt, bár az inzerten az apikális H₂O₂ kezelést követően az IL-8 apikálisan mérhető koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az inzert nélkül tenyésztett sejtek esetében. Az inzerten tenyésztett sejteknél az apikális H₂O₂ kezelést követően az IL-8 apikálisan mérhető koncentrációja szignifikánsan magasabb volt, mint bazolaterálisan. A probiotikus baktérium szűrletével (*Lactobacillus plantarum* 2142) történő kezelés legjobban a H₂O₂ kezeléssel együtt alkalmazva csökkentette szignifikánsan az IL-8 szekréciót az inzert nélkül szaporított sejtek esetében. Vizsgálataink szerint az IL-8 szekréció csökkenés időfüggő volt. Abban az esetben, amikor a probiotikus baktériumok szűrletét a H₂O₂ kezelés előtt vagy után alkalmaztuk, nem kaptunk szignifikánsan csökkenő változást a sejtek IL-8 termelésében.

Előkísérleteink alapján az IPEC-J2 sejtvonallal tervezett vizsgálatainkat a következőképpen végeztük: az oxidatív stressz okozta gyulladásos folyamatok tanulmányozására a sejteket kizárólag membrán inzerten szaporítottuk, az apikális és bazolaterális kompartmentek kialakulását a TER növekedésével kontrolláltuk. Az akut oxidatív stressz kiváltására 1 mmol/l H₂O₂ kezelést használtuk, mivel az nem okozott nekrozist a kezelést követő 24 órában. A génexpresszióban bekövetkező változásokat a H₂O₂ kezelést követően 0,5; 1, 2, 4 órával vizsgáltuk. A H₂O₂ hozzáadását a sejtekhez apikálisan végeztük és az IL-8 szekréciót mind az

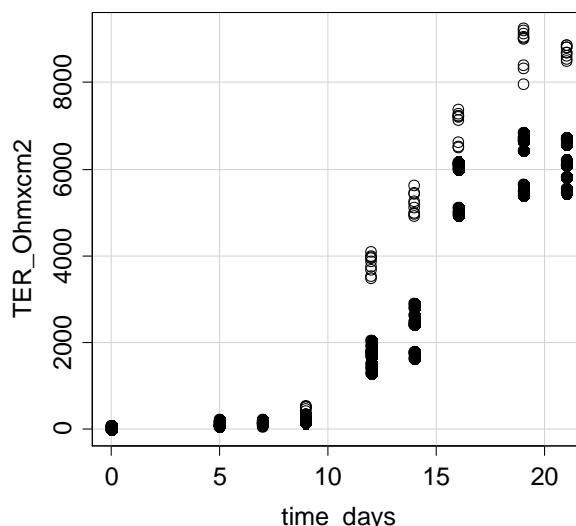
apikális, mind a bazolaterális kompartmentből meghatároztuk. Megállapítottuk, hogy a tejsavbaktériumok sejtmentes szűrletével történő kezelést a H_2O_2 kezeléssel együtt szükséges alkalmazni.

A 2009-es kutatási évben beszereztük az IPEC-J2 sejteket, amelyek optimális szaporodását ellenőriztük. Az IPEC-J2 sejtvonalat újszülött (12 óránál fiatalabb) sertés jejunumból izolálták. A sejtek fenntartásához és szaporításához DMEM/F12 (Mediatech) tápfolyadékot használtunk, amelyet kiegészítünk 5% hőinaktivált ($56^{\circ}C$, 30 perc) FBS-sel (Hyclone). A sejtek optimális életkörülményeinek biztosítása érdekében a médiumhoz 5 $\mu g/ml$ inzulint, 5 $\mu g/ml$ transferrint és 5 ng/ml szelént (ITS premix, BD Biosciences), valamint epidermális növekedési faktort (EGF, Fisher 5ng/ml) adtunk. Az alkalmazott antibiotikum penicillin/streptomycin keverék (500 I.U. penicillin/ml és/500 $\mu g/ml$ streptomycin) volt. A sejtek növekedése lassú (osztódási idő kb. 48 óra), ezért a passzálás 7-10 naponta történt. A passzálást 0,05% tripszin/0,02% EDTA oldattal végeztük, mely a sejteket nem károsította. A sejtek lefagyasztásához szükséges médium megegyezett a fenntartásukhoz alkalmazott tápfolyadékkal, kiegészítve 10% DMSO-val. A lefagyasztást a következő protokoll szerint végeztük: 4 óra $-80^{\circ}C$ -on ultramélyhűtőben izopropil-alkoholt tartalmazó fagyasztóedényben (Cryo 1 Degree C Freezing Container, NALGENE), majd 4 óra elteltével a sejteket folyékony nitrogénbe tettük és ott tároltuk a további felhasználásig (az eddig lefagyasztott sejtenyészetek száma 34 cső). A fagyasztási eljárás sikerességét többször ellenőriztük (letapadás 10-15%, konfluenssé válás 1-2 nap). A további kísérletekhez a folyékony nitrogénben tárolt sejteket használtuk és minden kísérlet sorozathoz újabb nitrogénben tárolt sejtenyészeteket indítunk, hogy elkerüljük a hosszú távú fenntartás során fellépő változásokat, amelyek során a sejtek fokozottan érzékenyvé válnak az oxidatív stresszel szemben, ami Caco-2 sejtek esetében is kialakul. A sejtek Mycoplasma mentességét szintén ellenőriztük (PCR vizsgálat).

I. KÜLÖNBÖZŐ TÍPUSÚ MEMBRÁN INZERTEKEN TENYÉSZTETT IPEC-J2 HÁMSEJTEK NÖVEKEDÉSE ÉS H_2O_2 -KEZELÉST KÖVETŐ GÉNEXPRESSZIÓJA

Vizsgálataink során a megfelelő modell kialakítása érdekében összehasonlítottuk a polikarbonát (PC) és a kollagénnel bevont poliészter (PE) inzertek hatását az IPEC-J2 sejtek polarizáltságára, valamint a hidrogén-peroxid kezelés hatását tanulmányoztuk a citokin expresszióra (2. ábra, 1. táblázat). A kollagénnel bevont poliészter (PE) inzerteken

tenyésztett IPEC-J2 sejtek már 1-2 nappal a kiültetés után maximálisan befedték az inzert felületét, ami mikroszkóppal jól megfigyelhető volt. A 8. naptól kezdve a transzepithelialis rezisztencia (TER) gyors növekedést mutatott és a 18-19. napra elérte a maximumát (~9-10000 Ohm \times cm²), ami a sejtek maximális polarizáltsági fokát mutatta. A polikarbonát (PC) inzerten a TER alakulása az idő függvényében hasonlóan változott, a sejtek azonban csak a 20-21. napra érték el a maximális TER-értékeket, ami azonban alacsonyabb volt, mint a kollagénnel bevont (PE) inzerteken tenyésztett sejtek esetében (~6-7000 Ohm \times cm²).

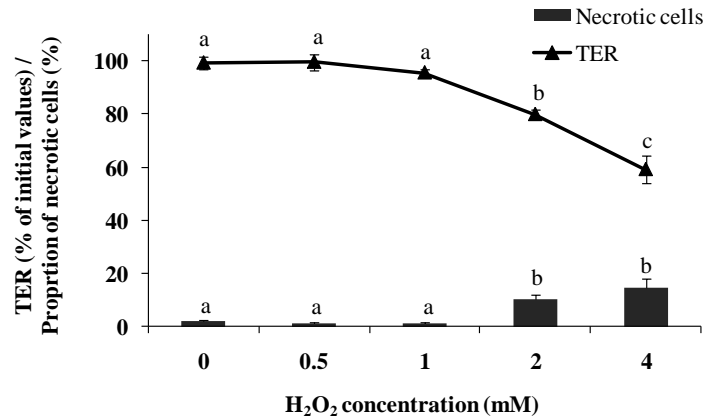


2. ábra A két különböző típusú inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejtek TER értékének alakulása. Üres körök kollagénnel bevont poliészter membrán (PE), telt körök polikarbonát membrán (PC).

1. táblázat A TER értékének jellemzői polikarbonát és kollagénnel bevont poliészter membránon tenyésztett sejteknél. Átlag \pm SEM, n=7

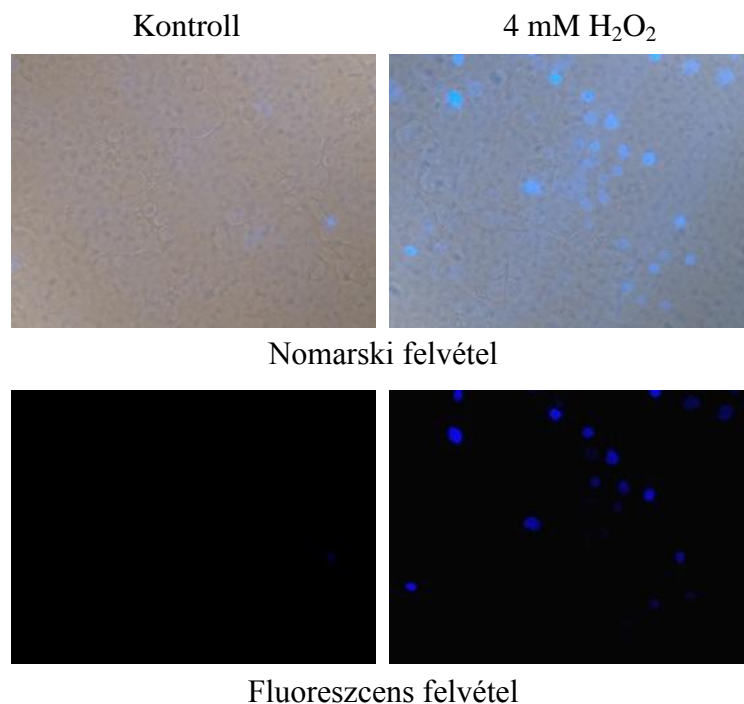
TER	Polikarbonát membrán (PC)	Kollagénnel bevont poliészter membrán (PE)
TER növekedés kezdete	8. nap	8. nap
TER növekedésének napi mértéke	663 Ohm \times cm ²	803 Ohm \times cm ²
Maximális TER	6135 \pm 154 Ohm \times cm ²	8703 \pm 46 Ohm \times cm ²

Megállapítottuk, hogy a kollagénnel bevont poliészter membrán inzert alkalmasabb az IPEC-J2 sejtek tenyésztésére, mint a polikarbonát inzert (TER növekedés mértéke és a végső TER magasabb az előbbi esetben). A 0.5-1 mM H₂O₂-vel való kezelés nem változtatta meg az IPEC-J2 tenyészet TER-jét, 2 mM ~20%-os, 4 mM ~40%-os csökkenést okozott. A 0.5-1 mM H₂O₂-vel való kezelés nem okozott az IPEC-J2 tenyészetben nekrozist, míg 2 mM a sejtek ~10%-ában, 4 mM ~15%-ában okozott nekrozist (**3., 4. ábrák**).



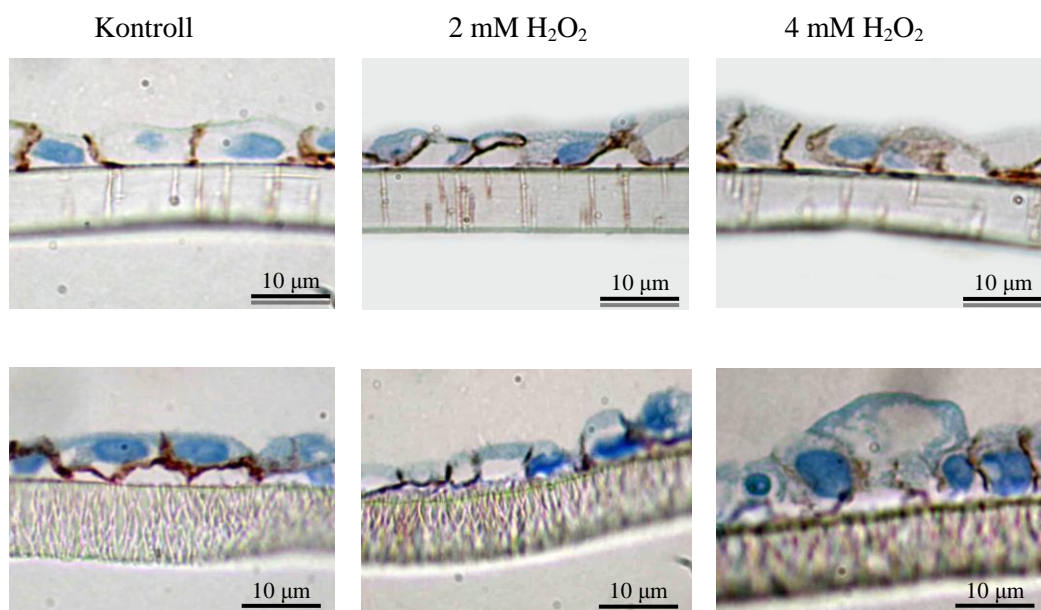
3. ábra H₂O₂ kezelés hatása a TER és a nekrotikus sejtek %-os alakulására. A különbözően jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns ($P < 0,05$) Átlag \pm SEM, $n=3$

A nagyobb hidrogén-peroxid koncentrációknál mért mérsékeltebb génexpresszió növekedésre a sejtenyészet sérülése adhat magyarázatot; ezt bizonyítja, hogy a hidrogén-peroxid koncentráció emelésével megnőtt a nekrotikus sejtek aránya (DAPI festés).



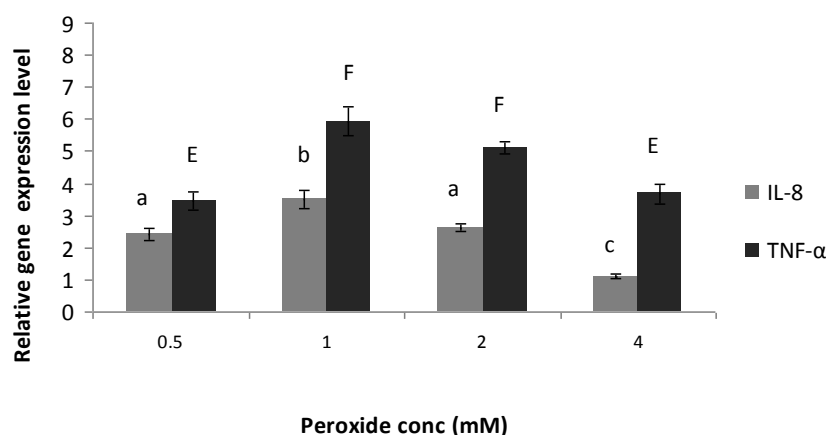
4. ábra H₂O₂ kezelés hatása a nekrosis mértékének alakulására kollagénnel bevont poliészter membrán inzertten tenyésztett IPEC-J2 sejtenyészetben. A DAPI festés alapján (kék színben előtűnő fluoreszcencia) megállapítható, hogy a 0.5-1 mM H₂O₂-dal történő kezelés nem okoz sejtkárosodást. A 2 és 4 mM H₂O₂-dal történő kezelés a sejtek ~10 illetve ~15%-ában nekrozist okoz.

A vizsgált sejtkapcsoló fehérjék (E-cadherin, claudin-1) eloszlásában nem tapasztaltunk változást a H₂O₂ kezelés hatására (**5. ábra**).



5. ábra Sejtkapcsoló fehérjék kimutatása kollagénnel bevont poliészter membrán inzerten tenyésztett egyrétegű IPECJ-2 sejtenyészetben. A sejteket hidrogén-peroxid eltérő koncentrációival 1 órán át kezeltük. Az E-cadherint (felső sor) és a claudin-1 (alsó sor) kimutatása immunhisztokémiai módszerrel történt. A sejtek közötti barna színreakció az E-cadherin és a claudin-1 pozitivitást mutatja. A membrán pórusai a felvételeken jól kivehetők.

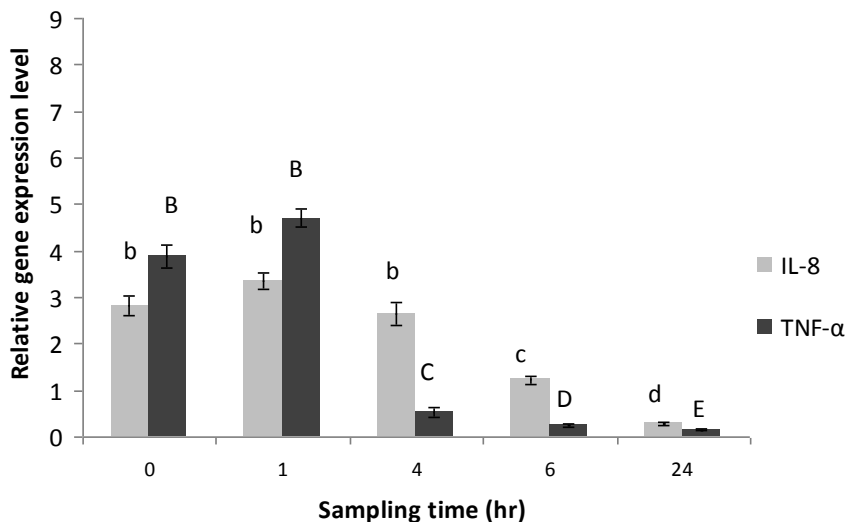
A gyulladásos citokinek szintjének változását az alkalmazott peroxid mennyisége és a kezelés után választott regenerálódási idő jelentősen befolyásolja. Az IL-8 és a TNF- α expressziója (qRT-PCR) 1 mM hidrogén-peroxid hatására emelkedett meg a legnagyobb mértékben a PE, inzerten, a koncentráció további növekedésével az up-reguláció mértéke fokozatosan mérséklődött: az IL-8 expressziója már 4 mM hidrogén-peroxiddal való kezelésnél visszatért az alapszintre, míg a TNF- α esetében ez a kezelés az up-reguláció mértékét csökkentette (**6. ábra**). A H₂O₂ adása nem változtatta meg az IL-6 szintjét a 0.5-4 mM koncentráció tartományban.



6. ábra Az IL-8 szintje megemelkedett 0.5-2 mM H₂O₂ hatására, a legnagyobb expressziót (~3.5x) az 1 mM H₂O₂ kezelés esetében tapasztaltuk. A TNF- α szintje 0.5-4 mM H₂O₂

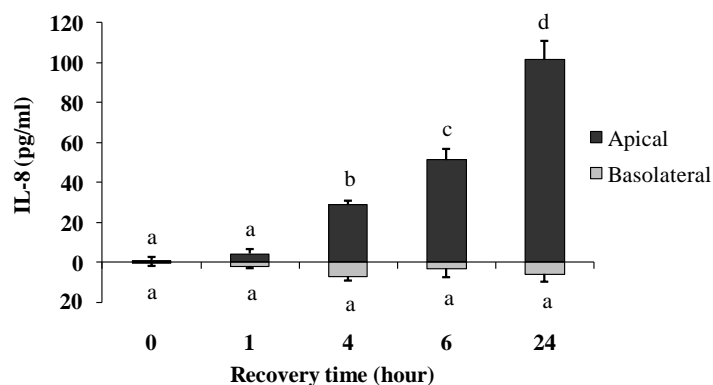
hatására megnövekedett, a leginkább (5-6x-os növekedés) 1-2 mM H₂O₂ kezelés esetében. A különbözően jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05) Átlag ± SEM. n=3

A H₂O₂ kezelés mintavételi idő függvényében is befolyásolta az IL-8 és TNF-α citokinek génexpresszióját (7. **ábra**), míg az IL-6-ét nem változtatta meg.



7. ábra Az IL-8 expressziója növekedést mutatott a kezelés után 4 óráig, majd a transzkripció erőteljesen lecsökkent (~3.5x-ös down-reguláció). A TNF-α szintje megemelkedett a kezelés után 1 óráig, majd szintén erőteljesen lecsökkent (~6x-os down-reguláció). A különbözően jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05) Átlag ± SEM. n=3

Az IL-8 citokin mennyisége az apikális médiumban idő-függő módon növekedést mutatott, míg a bazolaterális médiumban nem változott meg (8. **ábra**).



8. ábra Az IL-8 kimutatása ELISA módszerrel. Az IL-8 mennyisége megnőtt az apikális médiumban 1 mM H₂O₂ kezelés hatására. A növekedés a kezelés után 4 órával már mérhető volt (60 pg/ml). A kezelés után 24 órával 135 pg/ml IL-8 szint volt mérhető. A bazolaterális médiumban az IL-8 mennyiségének változását nem tapasztaltuk.

A hidrogén-peroxid kezelés egyik koncentrációban és egyik inzert esetében sem volt hatással az IL-6 expresszió szintjére. A mért citokinek expressziója bár hasonlóan alakult mindkét

inzert esetében, a jobb polarizáltság (differentiáltság) miatt a kollagénnel bevont PE membrán inzert alkalmasabbnak bizonyult az IPEC-J2 sejtek tenyésztésére, mint a PC membrán inzert, továbbá az 1 mM, egy órán keresztül tartó hidrogén-peroxid kezelés tűnt a legmegfelelőbbnek, mivel a TER változást nem mutatott.

A bemutatott I. számú munkából a következő publikációnk jelent meg:

Erzsebet Paszti-Gere, Edina Csibrik-Nemeth, Krisztina Szeker, Rita Csizinszky, Csaba Jakab, Peter Galfi: Acute Oxidative Stress Affects IL-8 and TNF- α Expression in IPEC-J2 Porcine Epithelial Cells. INFLAMMATION doi: 10.1007/s10753-011-9403-8. p. 11 (2011)

II. Hogyan befolyásolja az oxidatív stressz és a probiotikumokkal történő kezelés a sertésbélhámsejtek aktivitását?

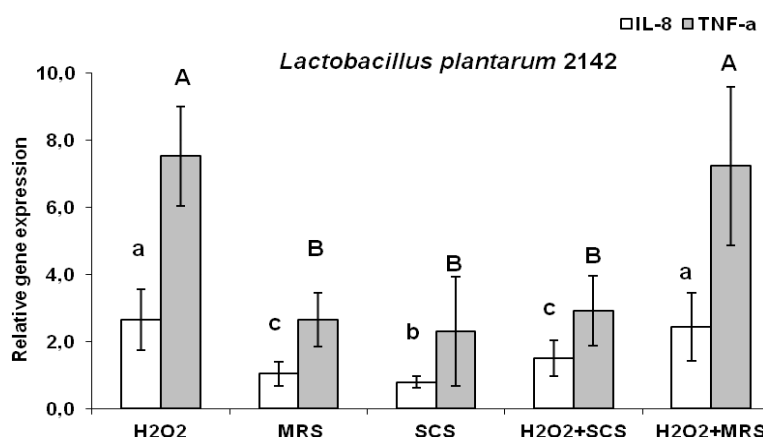
Kutatási munkánk eredeti célja egy olyan *in vitro* rendszer létrehozása volt, amely a bélgyulladást előidéző, kísérleti körülmények között hidrogén-peroxid kezeléssel kiváltott, akut oxidatív ingerek modellezésére valamint a védő hatású vegyületek tesztelésére alkalmazható. Vizsgálataink arra irányultak, hogy a probiotikumok sejtmentes felülűszója hogyan befolyásolja a bélhámsejtek oxidatív stresszre adott válaszát, és képes-e megvédeni azokat a károsodásoktól. Célunk volt továbbá, hogy a bakteriális felülűszóból olyan aktív komponenseket azonosítsunk, amelyek szerepet játszhatnak a védőhatásban.

Az akut oxidatív stressz és a probiotikumok hatásának vizsgálatához kollagénnel bevont poliészter membrán (PE) inzerten tenyésztett, újszülött sertés jejunum eredetű IPEC-J2 sejtvonalat alkalmaztunk. A peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtekben a gyulladásos citokinek (IL-8 és TNF- α) és a védő hatású hősokk fehérje 70 (Hsp 70) relatív génexpresszióját kvantitatív real-time PCR-rel határoztuk meg a probiotikus baktériumtörzsek (*Lactobacillus plantarum* 2142, *Lactobacillus casei* Shirota, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940, *Enterococcus faecium* CECT 4515) felülűszójának (SMSz=SCS), illetve a rövid szénláncú szerves savak hozzáadását követően. O-dianizidin festékképzési módszeren alapuló méréssel vizsgáltuk az általunk használt probiotikum SCS-ek és a hidrogén-peroxid közötti kémiai interakció jelenlétét.

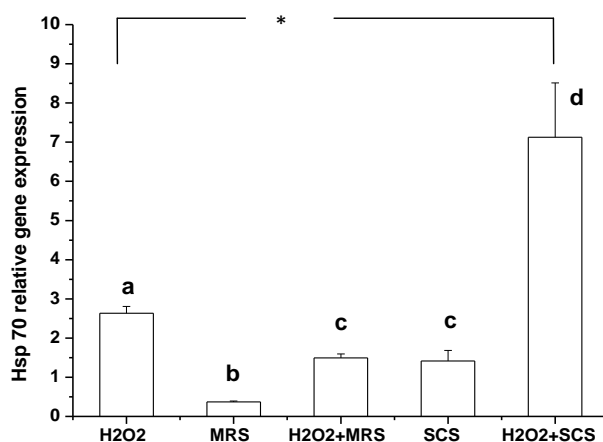
A *L. plantarum* 2142 sejtmentes felülűszójában lévő anyagcsere termékek koncentrációfüggő változásokat okoztak a citokin génexpresszióban. Az 1mM H₂O₂-dal kiváltott citokin

expressziót az alacsonyabb dózisban alkalmazott sejtmentes felülűsző (3,33%v/v és a 6.66%v/v) nem befolyásolta, az indikátor citokinek szintjének emelkedése ugyanolyan mértékűnek adódott a szűrletet is tartalmazó illetve a csak 1 mM hidrogén-peroxiddal kezelt minták esetében. Nagyobb koncentrációban, 13,3%v/v-ban jelenlévő sejtmentes felülűsző azonban szignifikánsan gátolta a hidrogén-peroxiddal kezelt IPEC-J2 sejtekben az IL-8 és a TNF- α expresszió szintjének növekedését. Kísérleti eredményeink alátámasztják, hogy a *L. plantarum* 2142 anyagcseretermékei IPEC-J2 bélhámsejteken oxidatív stressz körülményei között a gyulladásos citokin génexpresszió upregulációját hatékonyan csökkentik.

A *Lactobacillus plantarum* 2142 SMSz nemcsak hatékonyan csökkentette az IL-8 és a TNF- α szintjét, hanem növelte a Hsp70 génexpresszióját (9., 10. ábra).



9. ábra A *L. plantarum* 2142 SCS hatása az IL-8 és TNF- α expresszióra. Az IPEC-J2 sejteket 1mM H₂O₂-val, illetve felülűszővel/ tápoldattal való kombinációban (H₂O₂+13,3 v/v% SCS, H₂O₂+13,3 v/v% MRS (baktérium tenyésztésre használt tápfolyadék) kezeltük. A különböző betűkkel jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05) Átlag \pm SEM. n=3



10. ábra A *L. plantarum* 2142 SCS hatása a Hsp70 expresszióra. Az IPEC-J2 sejteket 1mM H₂O₂-val, illetve felülűszővel/ tápoldattal való kombinációban (H₂O₂+13,3 v/v% SCS,

H₂O₂+13,3 v/v% MRS (baktérium tenyésztésre használt tápfolyadék) kezeltük. A különböző betűkkel jelölt csoportok közti eltérés szignifikáns (P<0,05) Átlag ± SEM. n=3

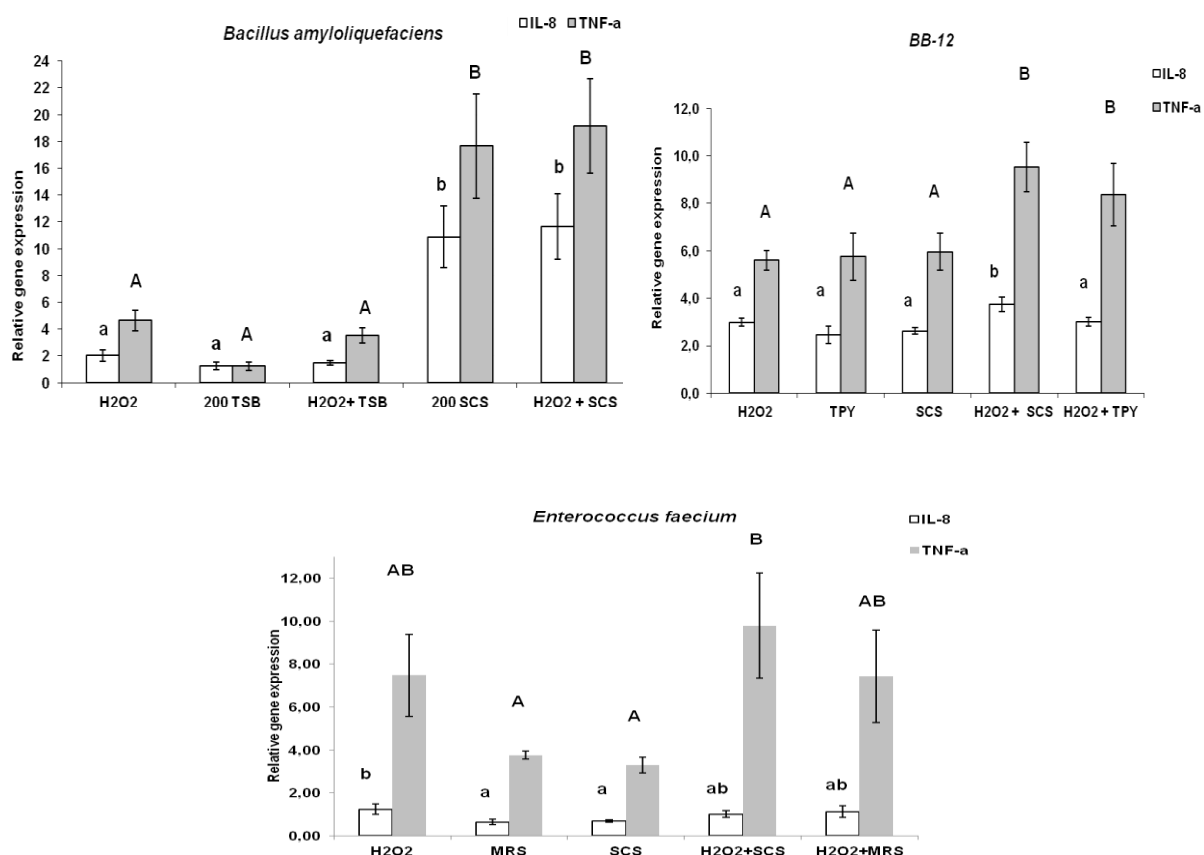
Kimutattuk, hogy a gyulladáscsökkentő hatás alapja nem a felülúszó és a hidrogén-peroxid közötti kölcsönhatás (**2. táblázat**). Nincs kémiai reakció ($p > 0.05$) a *L. plantarum* 2142, *E. faecium*, *L. casei* Shirota felülúszója és a H₂O₂ között. A *B. amyloliquefaciens* felülúszójában lévő termékek esetében szignifikáns peroxidbontás detektálható. A BB-12 tápoldata cisztein tartalma miatt önmagában is elősegítheti a peroxid bomlását

2. táblázat Kémiai interakció vizsgálata a kiválasztott probiotikumok anyagcseretermékei és a hidrogén-peroxid között o-DA alapú spektrofotometriás módszerrel.

A vizsgált oldatok összetétele	H ₂ O ₂ koncentráció (mM)		% -ban kifejezett csökkenési mérték
	Reakcióidő		
	0 h	1 h	
H ₂ O ₂	1,04 ± 0,09	0,86 ± 0,05	17,3
H ₂ O ₂ + MRS	0,96 ± 0,10	0,83 ± 0,08	13,5
H ₂ O ₂ + SCS (<i>L. plantarum</i> 2142)	1,02 ± 0,02	0,88 ± 0,04	13,7
H ₂ O ₂ + SCS (<i>L. casei</i> Shirota)	1,00 ± 0,03	0,86 ± 0,02	14,0
H ₂ O ₂ + SCS (<i>E. faecium</i>)	0,91 ± 0,07	0,84 ± 0,06	7,7
H ₂ O ₂ + TPY	0,86 ± 0,04	0,54 ± 0,07	37,2
H ₂ O ₂ + SCS (<i>BB-12</i>)	0,96 ± 0,01	0,54 ± 0,11	43,7
H ₂ O ₂ + TSB	0,72 ± 0,06	0,50 ± 0,05	30,5
H ₂ O ₂ + SCS (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	0,48 ± 0,04	0,03 ± 0,001	93,7

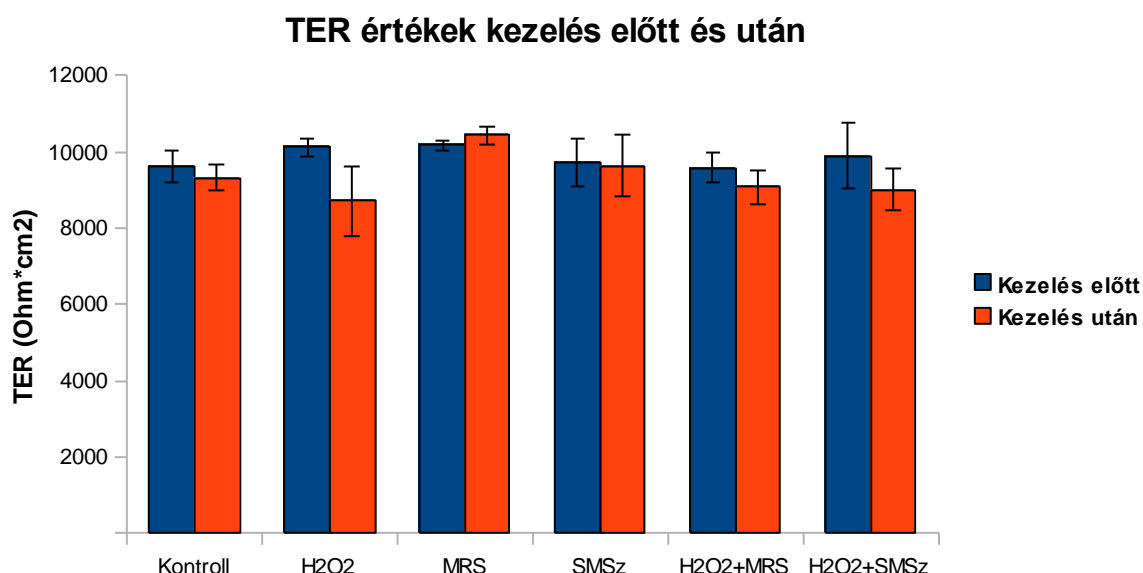
A probiotikumok jótékony hatásának kiszűrésére vizsgáltuk az akut oxidatív stressznek kitett IPEC-J2 sejtek gyulladásos citokin génexpressziójának módosulását felülúszók jelenlétében qRT-PCR módszerrel.

Vizsgálatok alapján az *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Enterococcus faecium* CECT 4515 védőhatással nem rendelkezik. A *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 felülúszója pedig szignifikánsan fokozta a TNF- α génexpressziót (**11. ábra**).



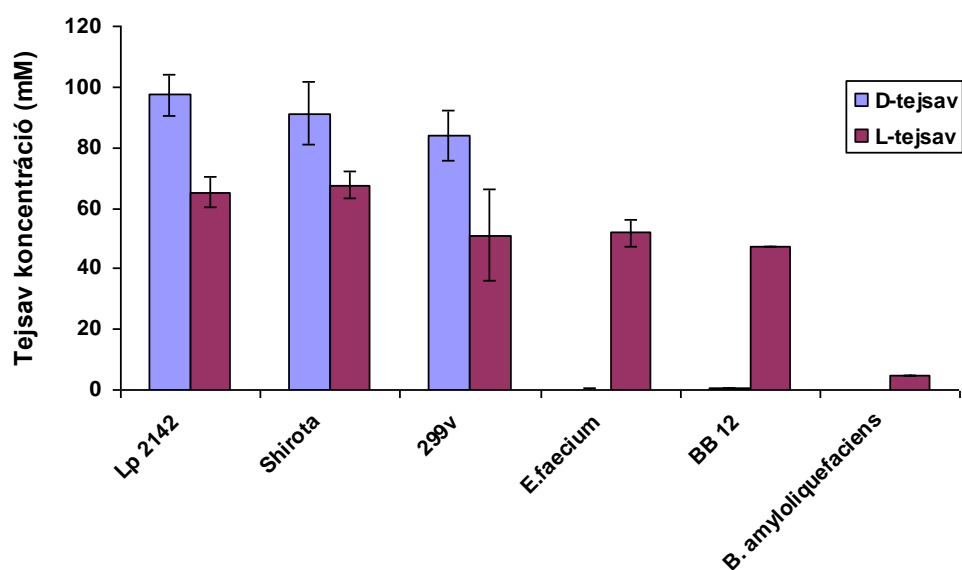
11. ábra A peroxid által indukált IL-8 and TNF- α upreguláció további növelése (immunstimuláns hatás) ($p < 0.05$) figyelhető meg, TSB-ben tenyésztett, az IPEC-J2 sejtekhez 13.3 v/v%-ban hozzáadott *Bacillus amyloliquefaciens* felülúszó hatására. Nincs szignifikáns különbség a peroxiddal és tápoldattal illetve a peroxiddal és *BB-12*-vel (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) kezelt sejtek gyulladásos citokin génexpressziójában. A peroxid által előidézett gyulladásos citokin génexpresszió növekedését IPEC-J2 sejtekben az *E. faecium* felülúszója sem mérsékelte ($p > 0.05$). A kísérleteket három párhuzamos méréssel végeztük, az eltérő betűk szignifikáns különbségeket jeleznek, a kisbetűk az IL-8, a nagybetűk a TNF- α értékekre vonatkoznak.

A **12. ábrán** a kísérletek előtti és a kezelések utáni TER értékek láthatók. Mindegyik kiindulási sejtenyészetben mért TER érték meghaladta a kísérletek elkezdésének feltételül szabott 8000 Ohm/cm² értéket, és egymástól szignifikánsan nem különböztek. A H₂O₂, illetve az SMSz vagy MRS hozzáadása sem változtatta meg markánsan a TER-t, ami arra utal, hogy egyik kezelés sem károsította súlyosan az enterocytá-monolayer integritását.



12. ábra Az IPEC-J2 sejteken mért TER értékek H₂O₂, SMSz (*L. plantarum* 2142 felülűző), MRS kezelések előtt és után. Az adatok TER érték ± S. E. M-ként kerültek feltüntetésre (n=3).

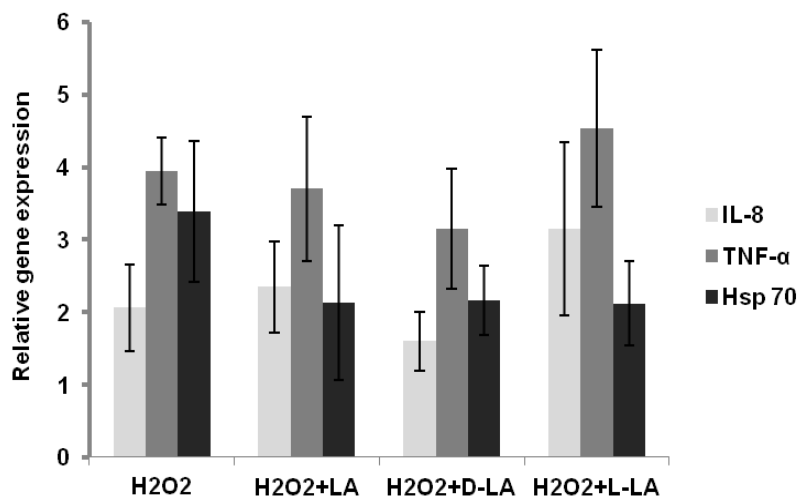
A kiválasztott baktériumtörzsek által termelt szerves savak gyulladáscsökkentésben betöltött szerepének meghatározásához végeztük el a tejsav mennyiségi meghatározását (**13. ábra**).



13. ábra A vizsgált baktériumtörzsek tejsav termelésének meghatározása enantiomer kimutatására alkalmas laktát dehidrogenáz enzim alapú méréssel (n=3). A tejsav koncentrációk (D- és L-tejsav) mmol/liter egységben kerültek feltüntetésre.

A racém-, D-, és L-tejsav szerepét a H₂O₂ kiváltotta oxidatív stresszben a gyulladásos citokinek és a Hsp70 hő sokkfehérje termelődésének mértékére a **14. ábra** mutatja be. Megállapítható, hogy nincs jelentős különbség a tejsav három módosulatának hatása között:

Statisztikailag nem bizonyítható, hogy bármelyik tejsav optikai izomer a felülszóban jelenlévő koncentrációban szignifikáns védőhatást gyakorolna az oxidatív stresszel szemben.

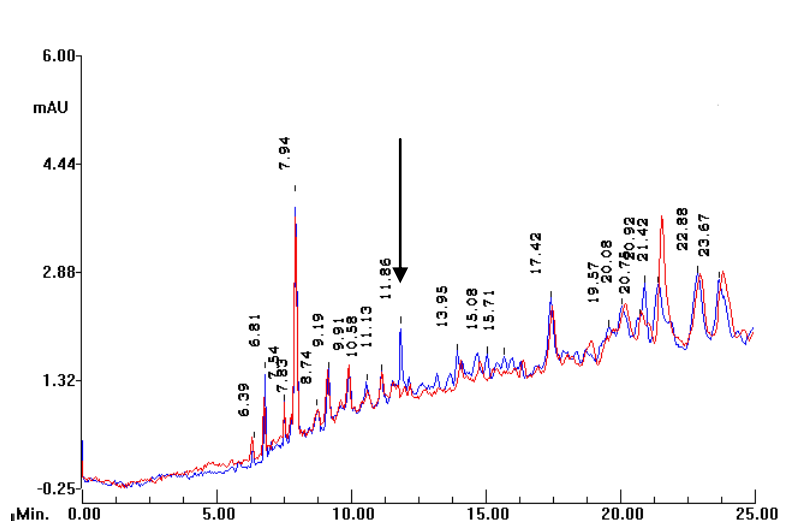


14. ábra Az IPEC-J2 sejteken mért IL-8, TNF-α, és Hsp70 relatív génexpresszió változásai H₂O₂ és tejsav (LA) kezelések hatására.

Eredményeink szerint a *Lactobacillus plantarum* 2142 által termelt tejsav (racém, L- és D-tejsav) nem csökkentette szignifikánsan a gyulladásos citokinek expresszióját. Fehérjeanalitikai módszerek segítségével sikerült kimutatni a *Lactobacillus plantarum* 2142 által termelt eltérő molekulatömegű fehérje jellegű anyagok jelenlétét.

A *L. plantarum* 2142 gyulladáscsökkentő hatásának hátterében jelentőségük lehet a peptid és fehérje termékeknek. A 7-200 kDa molekulatömegű fehérjék kimutatásához használt 15% SDS-PAGE elválasztás (festési eljárás: Coomassie Brilliant Blue R-250 és ezüst-nitrátos festés) három párhuzamos minta elemzése során két különböző fehérjét mutatott ki a *L. plantarum* 2142 SMSz-ben, amelyeket az MRS nem tartalmaz. A nagyobb mennyiségben jelen lévő, erősebb sávot adó fehérje mérete a 20-29 kDa közti tartományban van (kb. 21,5 kDa), a halványabb sávot adó másik termék molekulatömege 29 és 37 kDa közötti (kb. 31,5 kDa).

Kapilláris zónaelektroforézis segítségével kis molekulatömegű peptidok (<7 kDa) jelenlétét mutattuk ki. A **15. ábrán** látható elektroforetogramon egy olyan SMSz-ben jelenlévő anyag csúcsa látható, amely a kontrollként használt tápleves, az MRS görbájén nem található meg. Ez a *L. plantarum* 2142 -specifikus peptid 11,86 perces retenciós idővel volt eluálható a kapillárisról.



15. ábra A kapilláris zónaelektroforézis (UV detektálás, 200 nm) során kapott elektroforetogram, amely a *Lactobacillus* felülúszó (SMSz, kék görbe) és a tápleves (MRS kontroll, piros) kis molekulatömegű peptidjeit mutatja. Nyíl jelzi a *Lactobacillus plantarum* 2142-specifikus peptidet ($t_{\text{ret}}=11,86$ percnél)

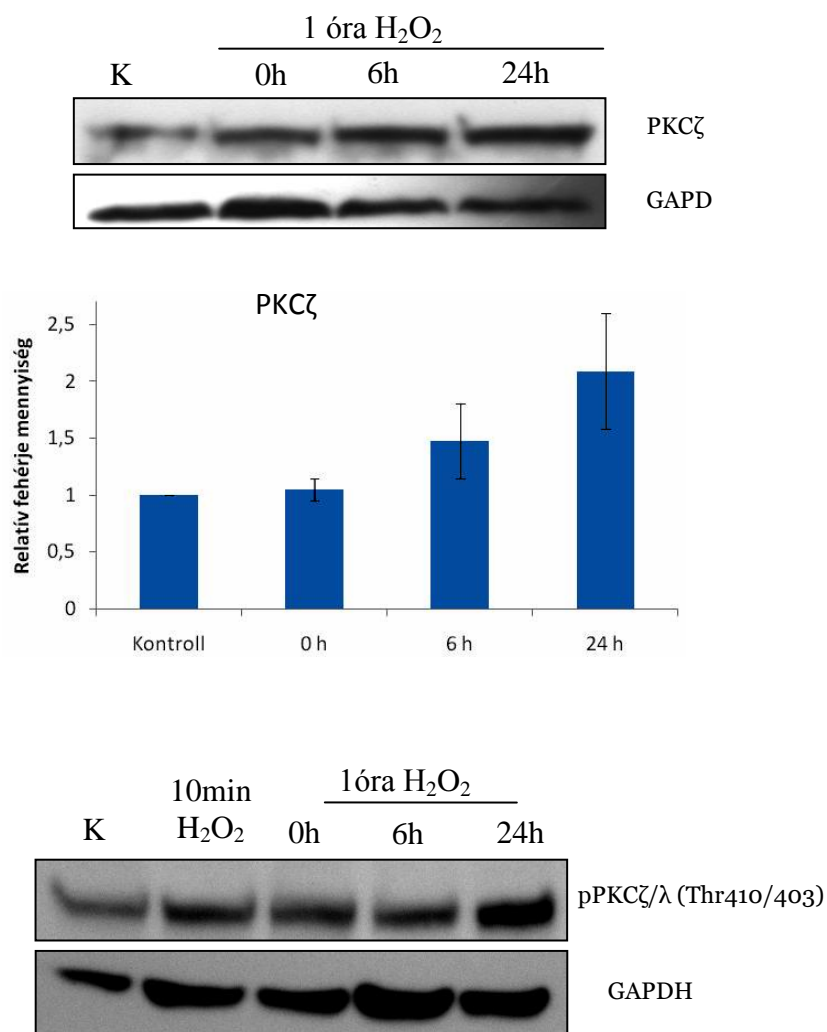
A bemutatott II. számú munkából a következő publikációt nyújtottuk be:

Erzsebet Paszti-Gere, Krisztina Szeker, Edina Csibrik-Nemeth, Rita Csizinszky, Andras Marosi, Orsolya Palocz, Orsolya Farkas, Peter Galfi: *Metabolites of Lactobacillus plantarum 2142 prevent oxidative stress-induced overexpression of proinflammatory cytokines in IPEC-J2 cell line INFLAMMATION* (pozitív bírálói visszajelzéssel) (2011)

III. IPEC-J2 SERTÉS VÉKONYBÉLHÁM SEJTEK PKC IZOENZIM MINTÁZATA (Jelátviteli mechanizmusok aktiválódása oxidatív stressz esetén)

Számos irodalmi adat támasztja alá a protein kináz (PKC) izoenzimek kulcsszerepét oxidatív stressz hátterében meghúzódó jelátviteli folyamatok esetén. A protein kináz C (PKC) izoenzimjei közé tartoznak a PKC α , PKC β I, PKC β II, PKC γ (cPKC), az n PKC-k, mint a PKC δ , PKC ϵ , PKC θ , PKC η és az atípusosak, mint a PKC λ , PKC ζ és PKC ι .

Western-blot módszerrel végzett kísérleteink során azt találtuk, hogy a kollagénnel bevont poliészter inzerteken polarizálódott (differenciálódott) IPEC-J2 sejtek PKC ζ szintje magas volt, továbbá kimutathatóak voltak a PKC α , PKC δ , PKC ϵ és PKC η izoenzimek. Ugyanakkor teljesen hiányzott a PKC γ . Ez összhangban van azokkal a tanulmányokkal, amelyek szerint a PKC γ elsősorban a bélhám kriptá sejtjeire (nem differenciált) jellemző, míg a villus sejtekből (differenciált) szinte teljesen hiányzik. Az 1 mM hidrogén-peroxid kezelés hatására a PKC α szintje a kezelés után 6 órával megemelkedett, míg a PKC ϵ szintje emelkedő, majd csökkenő tendenciát mutatott. Legjelentősebb változásokat a PKC ζ szintjében mutatkozott, ennek tendenciája növekvő volt (**16. ábra**). A PKC δ és PKC η szintje változatlan maradt.



16. ábra A kísérletek során a pPKCζ (felső kép) és a pPKCζ/λ (Thr410/403) (alsó kép) foszforilált alakjait is vizsgáltuk. A foszforiláció a molekula aktiválódását, és a további jelátviteli mechanizmusban betöltött szerepét mutatja. A vizsgálatok szerint a p-PKCζ/λ molekulában a 410/403 helyen lévő tirozin foszforiláció a hidrogén-peroxid kezelést követően fokozódik. Feltehetően ezek a mechanizmusok játszanak szerepet a citokinek expressziójának változásában.

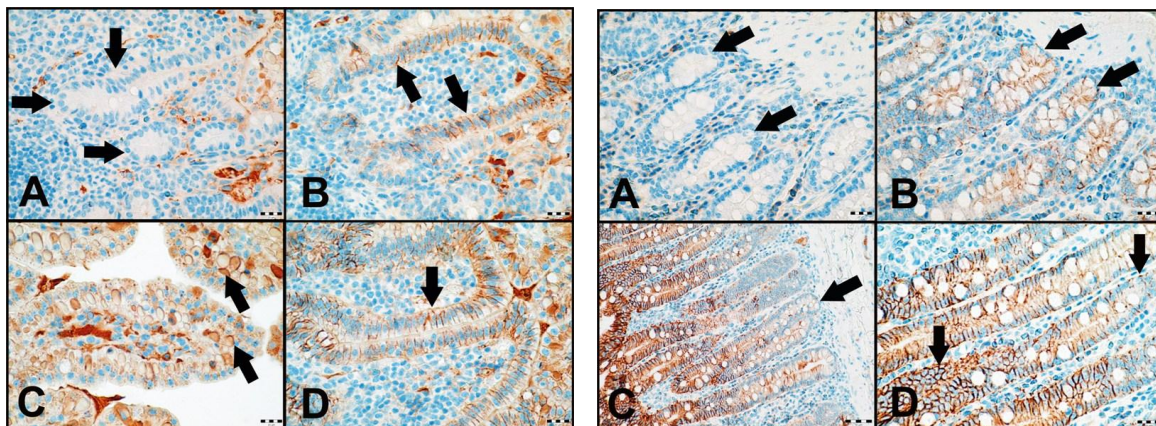
A PKCζ izoenzim több tanulmányban is szerepel, mint az oxidatív károsodásra reagáló PKC enzim, ezért vizsgálata közelebb vihet majd a probiotikumok gyulladásos folyamatokban betöltött védő hatásának alaposabb megértéséhez.

A bemutatott III. számú munka alapjául szolgált a következő publikáció:

Dorota Garczarczyk, Krisztina Szeker, Peter Galfi, Adam Csordas, Johann Hofmann: Protein kinase Cγ in colon cancer cells: Expression, Thr⁵¹⁴ phosphorylation and sensitivity to butyrate-mediated upregulation as related to the degree of differentiation CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTION 185(1): 25-32. (2010)

IV/A Tight junction vizsgálatok: Claudin-1, -4 és -7 immunhisztokémiai kimutatása sertésjejunumból

A claudin-1, -4, és -7 immunhisztokémiai vizsgálatát újszülött és kifejlett sertések jejunumában is elvégeztük (17. ábra).



17. ábra Bal oldal: A. Az újszülött malac jejunum claudin-1 negatív (nyílak). (IH, 400x, Szakaszc: 20 μ m). B. Claudin-4 membrán pozitivitás újszülött malac jejunumban (nyílak) (IH, 400x, Szakaszc: 20 μ m). C. Fals claudin-4 pozitivitás a villus apikális részén a tubulovezikuláris rendszerben (nyílak) (IH, 400x, Szakaszc: 20 μ m). D. Intenzív diffúz lineáris membrán claudin-7 pozitivitás a formalinnal fixált paraffinba ágyazott jejunum mintákban (nyílak). Jobb oldal: A. Claudin-1 negativitás felnőtt sertés jejunumban (nyílak). B. Claudin-4 membrán pozitivitás felnőtt sertés jejunumban (nyílak). C. Gyenge claudin-7 pozitivitás a kripta sejtekben (nyílak) és erőteljesebb claudin-7 pozitivitás a felnőtt sertés jejunumában található villusok proximális bélhámsejtjeiben. D. Diffúz lineáris claudin-7 pozitivitás a felnőtt sertés jejunumban (nyílak) (IH, 400x, Szakaszc: 20 μ m).

A bemutatott IV.A számú munkából a következő publikációt nyújtjuk be:

Csaba Jakab, Erzsebet Paszti-Gere, Gyula Balka, Peter Gálfi: Expression of claudin-1, -4, -7 proteins in small intestine of swine (Immunohistochemical study) (közlésre előkészítve ACTA VETERINARIA HUNGARICA)(2012)

IV/B Tight junction vizsgálatok: A gentamicin permeációja IPEC-J2 egyrétegű sejtenyészetben

Kísérleteinket teljesen polarizálódott ($TER > 8000 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$), inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejtenyészeteken végeztük. A sejteket apikálisan kezeltük önmagában 1 mg/ml gentamicin-szulfáttal, illetve 1 % DMSO-val kiegészített gentamicin-szulfáttal, majd 0 (kontroll), 1 illetve 6 óra múlva mintát vettünk az apikális és bazolaterális tápfolyadékából a gentamicin mennyiségi meghatározásához. A vizsgálat kontrolljaként IPEC-J2 sejtréteget nem tartalmazó

inzertek szolgáltak. A gentamicin-szulfát meghatározását nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel végeztük, Merck LaChrome Elite HPLC-s készülékkel. A meghatározás származékképzéssel történt, Fmoc reagens segítségével. Kromatográfiás módszerünket a hatályos irányelvek alapján validáltuk.

Eredményeink szerint a sejt nélküli inzerteken végzett vizsgálatban 6 óra alatt a gentamicin koncentrációja az apikális és a bazolaterális kompartmentben teljesen megegyezett (**3. táblázat**). Az egyrétegű sejten végzett mérések során azonban a gentamicin sem önmagában, sem 1% DMSO jelenlétében nem jelent meg a bazolaterális kompartmentben, ami igazolja a tight junction kapcsoló struktúra jelenlétét.

3. táblázat A gentamicin koncentrációi (%) az IPEC-J2 sejt egyréteget tartalmazó és a sejtmentes membrán inzertek apikális és bazolaterális kompartmentjeiben. A 100% a kezdeti apikális gentamicin koncentrációt jelenti.

Kezelés	Idő (h)	Inzert sejt nélkül		Egyrétegű sejtvonal	
		<i>Apikális kompartment (%)</i>	<i>Bazolaterális kompartment (%)</i>	<i>Apikális kompartment (%)</i>	<i>Bazolaterális kompartment (%)</i>
Gentamicin	0	100,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00
	1	72,38±1,07	26,47±1,52	100,00±0,00	0,00±0,00
	6	52,13±0,53	46,81±0,32	99,94±0,01	0,05±0,01
Gentamicin + 1% DMSO	0	100,00±0,00	0,00±0,00	100,00±0,00	0,00±0,00
	1	72,67±1,15	27,12±1,29	100,00±0,01	0,00±0,00
	6	54,45±1,23	44,98±1,31	99,93±0,02	0,05±0,01

A bemutatott IV. B számú munkából a következő publikációt nyújtottuk be: Akos Jerzsele, Gabor Nagy, Krisztina Szeker, Rita Csizinszky, Csaba Jakab, Peter Galfi: 1% DMSO supplementation does not enhance penetration of gentamicin-sulphate across cell monolayer membranes in vitro (benyújtva JOURNAL OF MEMBRANE SCIENCE) (2011)

V. IN VIVO VIZSGÁLATOK

A probiotikumok a legígéretesebb antimikrobiális szerek közé tartoznak, amelyeket azért fejlesztettek ki, hogy megóvják az állatok egészségét, és megnöveljék a tápanyag hasznosítás hatékonyságát. A probiotikumokról igazolták, hogy azonos hatásfokkal rendelkeznek, mint a szintetikus antimikrobiális hozamfokozók (többek között antibiotikumok), melyeket korábban profilaktikumként alkalmaztak annak érdekében, hogy visszaszorítsák a káros bélbaktériumok növekedését és aktivitását. Európában, 2006 januárjában azonban teljesen betiltották a szintetikus hozamfokozók használatát. Azonban az antibiotikum hozamfokozók betiltása gazdasági hátrányokhoz vezethet az EU országaiban az együregű gyomrú állatok takarmányozásában, mivel az EU-n kívüli országokban még megengedett a hasmenés és az elhalásos bélgyulladás megelőzésére ilyen anyagok alkalmazása. Következésképpen a takarmányozásban a probiotikummal való takarmánykiegészítés elterjedésének kell a gazdasági hátrányt egyensúlyba hoznia. Az együregű gyomrú állatoknál különösképpen a probiotikumok segíthetnek abban, hogy az antibiotikum hozamfokozók betiltása után jelentősen megnövekedett terápiás célú antibiotikum kezelések visszaszoruljanak. Jelenleg az emésztőcső egészségi állapotának megőrzése a takarmányiparnak is fő kutatási területe, és a probiotikumok takarmány kiegészítőként való kifejlesztése és használata jelenti a legjobb alternatívát a probléma megoldásához.

A takarmányfelvétel és a takarmányhasznosítás tanulmányozása sertésekben

A kísérleteket az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben (2053 Herceghalom, Gesztenyés út 1.) végeztük az alábbiakban részletezett metodika szerint. A kísérleti teremben egyedi elhelyezés volt, így egyedi súlygyarapodást és takarmány-felvételt mértünk. A hőmérséklet a kísérlet ideje átlag 20 °C, míg a páratartalom 80% volt. Kísérleti állatok MNF_xML állományból származtak, kezelésenként 8 süldőt használtunk, fele-fele ivararányban. A kísérlet során használt takarmány összetételét a **4. táblázat** tartalmazza. Mindegyik kezeléshez ezt a takarmányt használtuk, a kontroll és kísérleti kezelések közötti különbség az volt, hogy a kísérleti kezelés során 0,15%-ban (13,6 mM) Na-n-butirát kiegészítést alkalmaztunk. A Na-n-butirát tartalmú táp etetése 28 napig történt. Az állatokat 115 napos korban az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézethez tartozó vágóhídon, engedélyezett körülmények között vágtuk le.

4. táblázat Hízó I. táp összetétele és számított tápanyag-tartalma (%)

Megnevezés	Hízó I. táp	
	Kísérleti	Kontroll
Kísérleti adalékanyag /Na-n-butirát/ Zeolit univerzal	0,15	0,15
Kukorica	57,91	57,91
Extrahált szója 46%	16,97	16,97
Extrahált napraforgó 37%	10,00	10,00
Korpa	11,37	11,17
Takarmány mész	1,30	1,30
MCP	1,10	1,10
NaCl	0,50	0,50
L-lizin-HCl	0,20	0,40
Hízó 0,5%-os premix*	0,50	0,50

*Premix összetétele: Fe 22400 mg/kg; Mn 16880 mg/kg; Cu 2800 mg/kg; Zn 20000 mg/kg; Se 84 mg/kg; Co 103 mg/kg; I 120 mg/kg; A-vitamin (E672) 2055863 NE/kg; D₃-vitamin (E671) 400000 NE/kg; E-vitamin (α-tokoferol) 4263 mg/kg; K₃-vitamin 102 mg/kg; B₁-vitamin 72 mg/kg; B₂-vitamin 269 mg/kg; B₆-vitamin 168 mg/kg; B₁₂-vitamin 1,88 mg/kg; Pantoténsav 794 mg/kg; Folsav 46 mg/kg; Biotin 4,8 mg/kg; Niacin 4409 mg/kg; Kolinklorid 72100 mg/kg; C-vitamin 1140 mg/kg

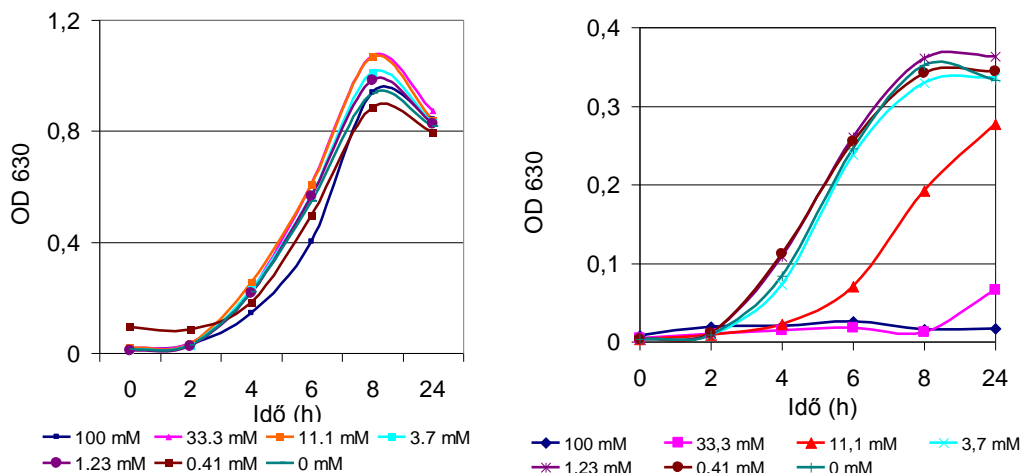
Munkánk során tanulmányoztuk a takarmányfelvétel és takarmányértékesítés mértékét (**5. táblázat**), továbbá az aktív komponens vékonybél irritáció mérséklésében kifejtett lehetséges védő hatásait az élő állatok szervezetében.

5. táblázat A butirát hatása a sertések takarmányfelvételére és hasznosítására

Paraméterek	Kontroll	Kísérleti
Kezdő tömeg, kg	36,8±1,3	37,1±1,3
Végső tömeg, kg	57,9±2,7	59,8±1,7
Napi testtömeg gyarapodás, g		
Hetek 1-2	625±48	750±45
Hetek 3-4	884±62	866±44
Hetek 1-4	754±52	808±34
Napi takarmány felvétel, kg		
Hetek 1-2	1,8±0,1	2,0±0,1
Hetek 3-4	2,3±0,1	2,4±0,1
Hetek 1-4	2,0±0,1	2,2±0,1
Takarmányértékesítés		
Hetek 1-2	2,83±0,1	2,61±0,2
Hetek 3-4	2,58±0,1	2,77±0,1
Hetek 1-4	2,71±0,1	2,75±0,1

Az értékek megadása átlag± S. E. M-ben történt (n=16, 115 nap).

A minták és az antibiotikumtól valamint a hozamfokozótól mentes takarmány butirát tartalmát gázkromatográfiával határoztuk meg. A *L. plantarum* 2142 szaporodásának propagációját a Na-n-butirát (10 mM fölötti koncentrációk esetén) indirekt módon segítette elő a bélflóra egyéb baktérium törzseinek, mint az *E. coli* szaporodásának visszaszorításával (**18. ábra**).



18. ábra A *L. plantarum* 2142 (bal oldali ábra) és az *E. coli* (jobb oldali ábra) szaporodása, Na- butirát kiegészítés (butirát koncentráció 0-100 mM) hatására pH=6-on. A baktériumok szaporodásának meghatározása optikai denzitásméréssel (OD) történt.

A mikrobiológiai analízisek során a tejsavbaktériumok tenyésztését MRS táptalajon (deMan Rogosa and Sharpe) végeztük 37°C-on 72 óráig. Az alacsony pH és a magas acetát koncentráció miatt a tejsavbaktériumok szelektív szaporodása révén a teljes tejsavbaktériumszám meghatározásra került vizuális kolónia számlálás alapján. A butirát kiegészítés hatására a vékonybélben szignifikánsan megemelkedett a tejsavbaktériumszám és ennek következtében a probiotikum által termelt tejsav mennyisége (**6. táblázat**).

6. táblázat A butirát tartalmú takarmány etetés hatása a tejsavbaktérium koncentrációra, a tejsavtartalomra és a pH-értékre sertések ileumában

Paraméterek	Kontroll	Kísérleti
Lactobacillus szám Log ₁₀ CFU/g ileum tartalom	8,43±0,32 ^a	9,29±0,40 ^b
D-Tejsav (mM/kg) ²	1,90±1,80	2,37±2,03
L-Tejsav (mM/kg) ²	21,32±3,81 ^a	30,78±7,34 ^b
pH ³	6,26±0,16	6,21±0,13

Átlag±S. E. M.

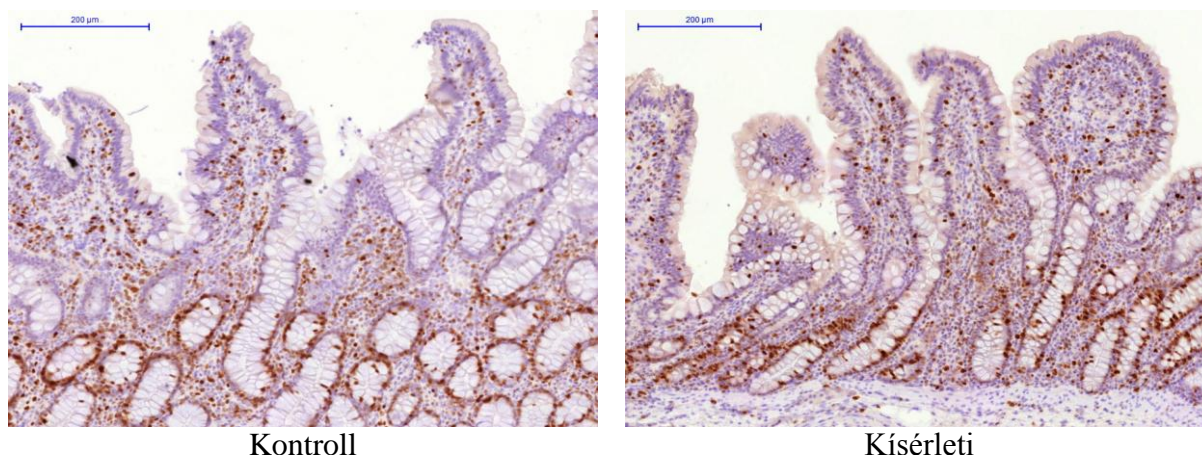
²mM/kg nedves tömeg

³Az ileum tartalom pH-értéke

^{ab}Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek (p<0.1).

Immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a szövetmintákat előkészítettük (dehidráálás, paraffinba ágyazás, metszés). Az osztódó sejtek számának meghatározását Ki67 proliferációs marker

festéssel végeztük. A szaporodó sejtek Ki67-et expresszálnak a kései G1, S, G2 and M fázisokban, a nyugvó G0-ban nem. A Ki67 pozitív sejtek mennyiségét 10 látómező alapján határoztuk meg a kriptasejtek között (**19. ábra**). A butiráttal kezelt sertés bélhámsejtekben a proliferáció mértéke szignifikánsan magasabb volt a kontroll értékekhez képest (**7. táblázat**).



19. ábra A takarmányba kevert butirát hatása a vékonybél (ileum) kriptasejtjeinek Ki67 pozitivitására (Fénymikroszkópos felvétel, vonal 200 µm).

7. táblázat Ki67 pozitív sejtek sertések ileumában

Paraméter	Kontroll	Kísérleti
Ki67 pozitív sejt/kripta	15,75±1,17 ^a	19,61±1,37 ^b
Átlag±SEM		

^{ab}Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek ($p < 0.1$).

Az ileum nyálkahártyaredőin előforduló bélbolyhok száma szignifikánsan magasabb volt a kontroll értékekhez képest (**8. táblázat**)

8. táblázat A butirát tartalmú takarmány etetés hatása az ileum nyálkahártyaredőin előforduló bélbolyhok számára

Paraméter	Kontroll	Kísérleti
Bélboholy/nyálkahártyaredő	19,30±1,73 ^a	26,77±2,45 ^b
Átlag±SEM		

^{ab}Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jeleznek ($p < 0.1$).

A vizsgálati eredmények kiértékelése, publikációra való előkészítése folyamatban van.